

ГУМЕРОВА РАУШАНИЯ ХАНИФОВНА

Оценка опасности и способы ремедиации нефтешламов,
содержащих природные радионуклиды

03.02.08 – экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ – 2013

Работа выполнена на кафедре прикладной экологии Института экологии и географии
Казанского (Приволжского) федерального университета

Научные руководители:	доктор биологических наук, профессор Селивановская Светлана Юрьевна
Официальные оппоненты:	кандидат биологических наук, зав.лаборатории «Бионанотехнология» Казанского национального исследовательского технологического университета Зарипова Сания Кашафовна доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией агроэкологии и микробиологии ГНУ Татарский НИИАХП Россельхозакадемии Дегтярева Ирина Александровна
Ведущая организация:	Башкирский государственный университет

Защита диссертации состоится «19» сентября 2013 г. в 17⁰⁰ часов на заседании
Диссертационного Совета ДМ 212.081.19 при ФГАОУ ВПО «Казанский
(Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, Республика Татарстан,
г.Казань, ул. Кремлевская, д. 18, ауд 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им Н.И. Лобачевского
Казанского государственного университета по адресу: г.Казань, ул.Кремлевская, д.35.

Автореферат разослан «____» _____ 2013 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
кандидат биологических наук, доцент



Р.М.Зелеев

Актуальность работы. Процесс добычи и переработки нефти сопровождается образованием отходов, количество которых может достигать 0,2-0,5% от полученной товарной нефти (Lazaretal., 1999; Morellietal., 2005; Ouyangetal., 2005; Roldan-Carrilloetal., 2011; Tahhanetal., 2011; Wangetal., 2012). Эти отходы содержат помимо большого количества тяжёлой нефти и природные радиоактивные элементы естественных радиоактивных семейств U^{238} и Th^{232} , а также K^{40} , которые ко-осаждаются из водо-нефтяной эмульсии в виде баритов (ElAfifi, Awwad, 2005; Bakretal., 2010). Нефтяные компоненты представлены смесью гидрофобных компонентов, многие из которых способны вызывать токсичные и мутагенные эффекты (Солнцева, 1988; Пиковский, 1988; Кураков с соавт., 2006; Reddyetal., 2011; Wangetal., 2012).

В настоящее время остаётся наиболее распространённой практика депонирования нефтесодержащих отходов в специальных накопителях или размещение на почве. Однако такое размещение приводит к миграции компонентов отходов с дождевыми осадками в почву и поступлению загрязняющих веществ в воду. Ситуация осложняется тем, что отходы, содержащие нефтепродукты и радиоактивные элементы, являются токсичными для окружающей среды. В литературе представлены данные о токсичности индивидуальных углеводородов, их смесей, почв и воды, загрязнённой нефтью (Saterbak et al., 2000; Van Gestel et al., 2003; Sabate et al., 2004; Molina-Barahona et al., 2005; Plaza et al., 2005; Xu et al., 2010; Frutos et al., 2012; Llado et al., 2012). Информация о токсичности отходов, содержащих и нефтепродукты, и радиоактивные элементы ограничена. В то же время она является крайне важной, поскольку многие соединения в отходах в процессе хранения трансформируются в метаболиты, токсичность и устойчивость которых неизвестна (Киреева с соавт., 2003; Кураков с соавт., 2006; Al-Mutairietal., 2008). Отсутствует также информация о миграции по почвенному профилю углеводородов и радиоактивных элементов и их влиянию на почвенные сообщества.

Сложность обращения с подобными отходами определяется многообразием их видов и состава, высокой опасностью. Физико-химические методы обработки нефтесодержащих отходов являются дорогостоящими, энергоемкими и сопряжены с образованием вторичных отходов, захоронение которых представляет дополнительную проблему (Ouyangetal., 2005; Das, Mukherjee, 2007; Biswaletal., 2009; Wangetal., 2012). В связи с этим активно развиваются направления, использующие биологические методы.

В литературе широко представлены данные о биоремедиации нефтезагрязнённых почв (Balbaetal., 1998; Bentoetal., 2005; Кураков с соавт., 2006; Wangetal., 2012; Lladoetal., 2013). Однако данные о деструкции углеводородов в отходах немногочисленны, при этом в основном обсуждается возможность их деструкции в жидких средах (ManaCapellietal., 2001; Biswaletal., 2011; Reddyetal., 2011). Публикации, посвящённые деструкции микроорганизмами нефтяных компонентов в отходах, содержащих природные радионуклиды, практически отсутствуют.

Цель настоящей работы – оценка воздействия компонентов отходов нефтедобывающего комплекса на почвенные системы и разработка способа их биоремедиации.

Задачи исследования.

1. Охарактеризовать радиоактивные отходы нефтедобывающего комплекса по уровню радиоактивности, содержанию нефтяных компонентов и их фракционному составу.
2. Оценить токсичность компонентов отходов с использованием элюатных (тесты на бактериях *Bacillus pumilus*, на инфузориях *Paramecium caudatum*, на водорослях *Scenedesmus quadricauda*, на низших ракообразных *Daphnia magna*, на пресноводных рачках *Thamnocephalus platyurus*, на коловратках *Brachionus calyciflorus*, на высших растениях *Raphanus sativus*) и контактных (тесты на растениях *Raphanus sativus*, на бактериях *Bacillus pumilus*) тестов.
3. Осуществить лабораторное моделирование процесса миграции компонентов нефтесодержащих отходов по почвенному профилю. Определить миграционную способность нефтяных компонентов и радиоактивных элементов. Оценить изменение состояния микробного сообщества почвенных колонок на основе анализа общей микробной биомассы, ферментативной активности, численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов в условиях воздействия.
4. Методами дисперсионного и кластерного анализов установить доминирующий фактор при воздействии на микробные сообщества отходов, содержащих нефтепродукты и радиоактивные элементы.
5. Осуществить лабораторное моделирование процесса ремедиации отходов нефтедобывающего комплекса с использованием приёмов биостимуляции и биоаугментации. Оценить изменение содержания радиоактивных элементов, нефтепродуктов, фракционного состава в процессе ремедиации. Выявить закономерности изменения функционирования микробных сообществ на основании анализа микробной биомассы, респираторной и ферментативных активностей, численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов. Определить изменение фитотоксичности в процессе ремедиации.
6. Методами молекулярной биологии выявить изменения в структуре микробных сообществ при ремедиации отхода.

Положения, выносимые на защиту.

Отходы, отобранные в товарном парке, содержат нефтепродукты, в составе которых доминируют насыщенные и ароматические углеводороды; среди радиоактивных элементов основным является радий.

Токсичность отходов по отношению к водным организмам, бактериям и растениям обусловлена содержанием в отходе нефтяных компонентов и их кислотностью. По уровню чувствительности к компонентам отходов биологические тесты составляют ряд тест с *D. magna*(30.1)>тест с *B. calyciflorus*(13.0)> тест с *P. caudatum*(12.3)>тест с *S. quadricauda*(7.6) ≥ тест с *R. sativus*(7.5)>тест с *T. platyurus*(6.2)>тест с *B. pumilus*(4.2)>тест «Эколюм» (1.0).

Размещение радиоактивных нефтесодержащих отходов на поверхности почвы приводит к миграции нефтяных компонентов и радионуклидов: достоверный негативный эффект на микробное сообщество оказывают нефтепродукты в верхнем 20-см слое почвы.

Оптимальным способом ремедиации отхода является его обработка с компостом.

Научная новизна. Впервые с использованием батареи тестов проанализирована токсичность радиоактивных отходов, образующихся в процессе добычи нефти, и установлено, что основной вклад в её формирование вносят нефтяные углеводороды, которые оказывают наибольший эффект в отношении простейших и водорослей и не влияют на активность бактерий. Показано, что контактные тесты на основе *R. sativus* и *B. pumilus* более чувствительны к компонентам отходов по сравнению с элюатными тестами на основе этих организмов. Выявлено, что отход, подвергнутый термической обработке, более токсичен по сравнению с исходным.

Впервые показано, что миграция радиоактивных элементов из отходов по почвенному профилю зависит от уровня содержания нефтепродуктов в отходе. Не выявлено негативного влияния радиоактивных элементов на функционирование микробного сообщества почв. Установлено, что вымываемые в почву нефтепродукты вызывают снижение уровня микробной биомассы почвы, наиболее выраженное в верхнем (0-20 см) почвенном горизонте, увеличение респираторной активности и численности углеводородокисляющих микроорганизмов.

Проведено сравнение эффективности биodeградации нефтяного компонента отходов при применении различных методов биоремедиации – ландфарминг, биостимуляция, биоаугментации и их сочетаний. Установлено, что методы биоаугментации эффективны при высоком содержании нефтепродуктов. Способом, обеспечивающим наиболее эффективное снижение нефтепродуктов, является обработка отхода компостом и специально селекционированными микроорганизмами.

Впервые методами молекулярной биологии показано, что при обработке почвы отходом происходит изменение структуры сообщества в сторону доминирования устойчивых к воздействию нефтяных компонентов видов микроорганизмов, идентифицированных как *Dyella* sp., *Sinobacter flavus* и *Parvibaculum lavamentivorans*.

Практическая значимость работы. Полученные в диссертационной работе результаты являются основой способа биоремедиации отходов нефтедобывающего комплекса. Полученные результаты могут быть использованы при разработке мер по минимизации негативного влияния нефтяных отходов на окружающую среду и совершенствованию отдельных аспектов экологического нормирования хозяйственной деятельности человека.

Результаты исследований используются при проведении практических работ по курсам «Управление в обращении с отходами», «Нормирование и снижение загрязнения окружающей среды» на кафедре прикладной экологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Апробация работы.

Материалы работы доложены на I городской студенческой конференции «Междисциплинарные исследования в области естественных наук» (Казань, 2008), 13 Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» (Новосибирск, 2008), Всероссийской научной конференции с международным участием «Окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований» (Казань, 2009), II Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы науки и техники» (Уфа, 2010), II международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Прогрессивные технологии и перспективы развития» (Тамбов, 2010), Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодёжи «Экологические проблемы нефтедобычи» (Уфа, 2010), Proceedings of the International Symposium "Euro-ECO - Hanover 2011": Environmental, Engineering (Hanover, Germany, 2011), II Международной научно-практической конференции «Современные проблемы безопасности жизнедеятельности: теория и практика» (Казань, 2012), 4th International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics (CEMERE) and SECOTOX Conference (Mykonos island, Greece, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 4 статьи в журналах из Перечня ВАК.

Личный вклад автора в работу состоит в выполнении экспериментальной части диссертации, обсуждении результатов и формулировании выводов на их основе. Соавторами публикаций являются научный руководитель д.б.н., проф. Селивановская С.Ю., к.б.н., доцент, Галицкая П.Ю., к.ф.-м.н., доцент Бадрутдинов О.Р., участвовавшие в обсуждении результатов. В создании программы для математической обработки результатов принимал участие к.ф.-м.н, д.б.н., проф. Савельев А.А.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 129 страницах; состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела собственных исследований и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа содержит 39 рисунков, 6 таблиц. Список литературы содержит 75 отечественных и 293 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 Обзор литературы

В обзоре литературы приведены характеристики отходов, образующихся при добыче и производстве нефти: содержание и фракционный состав нефтепродуктов, активная концентрация природных радиоактивных элементов (РЭ) ^{226}Ra , ^{232}Th и ^{40}K . Представлены данные о токсичности отдельных компонентов нефти, почв, загрязнённых нефтью, нефтесодержащих отходов и природных РЭ.

Основная часть обзора литературы посвящена влиянию загрязнения почв углеводородами на характеристики почвенного микробного сообщества: численность гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ), микробную

биомассу ($C_{\text{мик}}$), респираторную и ферментативную активность почв, структуру микробного сообщества. Произведён анализ публикаций, посвящённых биодegradации нефтяных углеводов (УВ) и современным способам рекультивации нефтезагрязнённых почв и нефтесодержащих отходов. Особое внимание уделено биологическим способам ремедиации: биостимуляции и биоаугментации.

Глава 2 Материалы и методы исследования

Объекты исследования, схема эксперимента. Объектами исследования являлись 16 отходов, отобранных в различных резервуарах Тихоновского товарного парка (Альметьевск, Республика Татарстан): М, С, Н, Р, Р1, Р2, И1, И2, И3, Н1, Н2, Н3, Н4, НТ1, НТ2 и НТ3. Отход Р1 был получен путем удаления нефтяных компонентов из отхода Р2.

Для моделирования процессов миграции компонентов отходов по почвенному профилю были отобраны 6 ненарушенных почвенных монолитов высотой 60 см. На поверхность колонок были помещены отход Р2 (колонок Н) и отход Р1 (колонок Р). Количество отходов было уравнено по содержанию РЭ. В качестве контрольных использовали колонки без внесения отходов (колонок К). Колонки орошали в течение месяца водой, имитируя дождевые осадки. Через месяц отходы удаляли с поверхности колонок, разбирали почву по горизонтам 0-20, 20-40 и 40-60 см. В образцах определяли содержание нефтепродуктов, РЭ, рН, электропроводность, показатели микробного сообщества ($C_{\text{мик}}$, респираторную, дегидрогеназную и целлюлазную активности, численность гетеротрофных бактерий и УОМ).

Для определения способа ремедиации использовали отход НТ1. Для этого отход вносили в почву в соотношении 1:4 (образец ОП); отход вносили в почву и добавляли компост в количестве 5% по массе (образец ОПК), в отход вносили компост в количестве 5% по массе (образец ОК); в отход вносили почву в соотношении 1:4, добавляли компост в количестве 5% по массе и вносили смесь двух штаммов микроорганизмов-деструкторов в количестве 250 мл на 1 кг отхода (образец ОПКМ); в отход вносили компост в количестве 5% и смесь двух штаммов микроорганизмов-деструкторов в количестве 250 мл на 1 кг отхода (образец ОКМ). В каждой из смесей доводили соотношение С:Н мочевиной до 10:1. В качестве контроля использовали отход без внесения добавок (образец О) и почва без внесения добавок (образец П). Отбор проб производили на 0, 7, 14, 21, 35, 49, 80 и 123 сутки инкубирования и измеряли содержание УВ, активность РЭ, $C_{\text{мик}}$, респираторную активность, численность гетеротрофных бактерий, выращенных на питательной среде МПА, УОМ. Фитотоксичность смесей определяли на 0, 14, 35, 80 и 123 сутки инкубирования.

Аналитические методы. Определение содержания нефтепродуктов в отходах, почве и водных экстрактах проводили методом ИК-спектromетрии с предварительной экстракцией четыреххлористым углеродом (ПНД Ф 16.1:2.2.22-98, 1998; ПНД Ф 14.1:2:4.5-95, 2004). Определение фракционного состава нефти проводили гравиметрическим методом после экстракции нефтяных компонентов из проб

малополярными растворителями в аппарате Сокслета и последующем разделении фракций методом колоночной хроматографии согласно Mishra et al., 2001. Определение общего азота в образцах отходов и почвы проводили по методу Къельдаля (ISO 11261:1995, 1995). Определение органического вещества проводили по методу Тюрина в модификации ЦИНАО (ГОСТ 26213-91, 1992). Значение pH определяли потенциометрическим методом в водном экстракте (ГОСТ 26423-85, 1985). Электрическую проводимость почвы определяли потенциометрическим методом в водном экстракте с помощью кондуктометра (ГОСТ 26423-85, 1985). Влажность определяли гравиметрическим методом (ГОСТ 5180-84, 2008). Измерение активности РЭ осуществляли с использованием сцинтилляционного гамма-спектрометра с программным обеспечением «Прогресс» (Методика измерения..., 2003).

Биотестирование отходов. Биотестирование водных экстрактов отходов проводили с использованием низших ракообразных *D. magna* (ПНД Ф 14.1:2:4.12-06, 2006), инфузорий *P. caudatum* (ФР.1.39.2003.00923, 2003), водорослей *S. quadricauda* (ПНДФ 14.1:2:3:4.10-04, 2004), пресноводных рачков *T. platyurus* (TamnotoxkitF, 2011), коловраток *B. calyciflorus* (RotoxkitF, 2011), коммерческого теста «Эколюм» (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04, 2004), высших растений *R. sativus* L (редис сорт «Красный круглый с белым кончиком») (ISO 11269-1, 1993), бактерий *B. pumilus* (Ronnpagel et al., 1997).

Контактное биотестирование осуществляли с использованием растений *R. sativus* L (редис сорт «Красный круглый с белым кончиком») (ISO 11269-2, 1995) и бактерий *B. pumilus* (Ronnpagel et al., 1997). Класс опасности определяли в соответствии с («Критерии отнесения...», 2001).

Методы оценки состояния почвенного микробного сообщества. Респираторную активность почвенного микробного сообщества оценивали путем титриметрического определения количества выделившегося CO₂ после поглощения щелочью (Microbiological..., 2006). С_{мик} вычисляли на основе субстрат-индуцированной респираторной активности (Microbiological..., 2006). Уреазную активность оценивали фотометрически по количеству ионов аммония, образующихся в результате восстановления мочевины (Хазиев, 2005). Дегидрогеназную активность оценивали колориметрически по количеству восстановленного ресазурина (Ronnpagel et al., 1997). Численность гетеротрофных микроорганизмов определяли путем посева на МПА, УОМ определяли методом предельных разведений на жидких средах с нефтью в качестве единственного источника углерода (Руководство ..., 1983).

Видовую идентификацию выделенных микроорганизмов-деструкторов осуществляли методами молекулярной биологии на основе анализа последовательности 16S рДНК. Обработку полученных хроматограмм проводили в программе Mega 8.02. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали базы данных www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Для анализа структуры микробного сообщества использовали метод анализа конформационного полиморфизма однокитевой ДНК.

Статистические методы анализа. Измерение всех параметров проводили не менее чем в трёхкратной повторности. В работе представлены значения средних и стандартных ошибок. Для объединения массивов данных в группы применяли кластерный анализ (Айвазян с соавт., 1989). Кластеризацию данных осуществляли методом Варда (Дюран с соавт., 1977). Для определения статистической значимости факторов миграции компонентов отходов применяли дисперсионный анализ (Шеффе, 1980).

Глава 3. Результаты и обсуждение

1. Характеристика отходов.

На первом этапе 16 отходов нефтедобывающего производства были охарактеризованы по содержанию нефтяных компонентов, природных РЭ, определён их фракционный состав, а также уровень влажности, кислотности и электропроводности. Установлено, что содержание нефтяных компонентов в отходах варьировало в широких пределах от 30,5 до 880 г/кг (табл. 1).

Таблица 1.

Содержание УВ и РЭ в отходах.

Отход	Содержание УВ, г/кг	Содержание, Бк/кг		
		²²⁶ Ra	²³² Th	⁴⁰ K
М	35,0 ± 7,0	11930 ± 2624	9399,0 ± 1879,0	-
С	59,0 ± 11,8	620,0 ± 136,0	347,0 ± 69,4	-
Н	153,1 ± 30,6	468,4 ± 103,1	247,2 ± 49,4	57,2 ± 8,6
Р	90,4 ± 18,1	1699,8 ± 373,9	296,2 ± 59,2	255,0 ± 38,3
И1	880 ± 176	70,7 ± 15,5	20,2 ± 4,1	28,3 ± 4,3
И2	95,4 ± 19,1	1809,8 ± 398,1	276,2 ± 55,2	255,0 ± 38,3
И3	720 ± 144	2739,0 ± 602,6	916,0 ± 183,2	271,1 ± 40,6
Р1	4,6 ± 0,9	7861,7 ± 1729,6	5085,9 ± 1017,2	2277,9 ± 341,7
Р2	560 ± 112	4402,5 ± 968,5	2848,1 ± 569,6	1275,6 ± 191,3
Н1	123,3 ± 24,6	34,0 ± 7,5	30,0 ± 6,0	59,0 ± 8,8
Н2	57,4 ± 11,5	282,0 ± 62,0	146,0 ± 29,2	51,0 ± 7,6
Н3	59 ± 11,8	246,0 ± 54,1	107,0 ± 21,4	60,0 ± 9,0
Н4	30,5 ± 6,1	430,0 ± 94,6	197,0 ± 39,4	139,0 ± 20,8
НТ1	640 ± 128	859,0 ± 199,0	385,1 ± 77,0	272,0 ± 40,8
НТ2	46,5 ± 9,3	1479,0 ± 325,4	123,6 ± 24,7	59,5 ± 8,9
НТ3	126,0 ± 25,2	317,6 ± 69,8	143,1 ± 28,6	82,4 ± 12,4

Фракционный состав отходов отличался для отходов с высоким и низким содержанием нефтяных компонентов. Для отходов с высоким содержанием нефти: большая доля нефтяных компонентов приходилась на фракции ароматических УВ и асфальтенов (32,3-38,5% и 26,2-28,3% соответственно), в меньшем количестве присутствовали алифатические УВ и смолы. В отходах с низким содержанием нефти насыщенные УВ составляли 35,4-36,3%, тогда как содержание остальных фракций было примерно одинаково и варьировало на уровне 19,3-23,8%. РЭ (²²⁶Ra, ²³²Th и ⁴⁰K) включаются в отходы с водой, проходящей через породы при добыче нефти и со-осаждаются в основном в виде комплексов радиобарита. Установлено, что доминирующим элементом в отходах являлся ²²⁶Ra, активная концентрация которого

составляла в отходах 34-11930 Бк/кг (табл. 1). В меньших количествах присутствовали ^{232}Th (20,2 - 9399,0 Бк/кг) и ^{40}K (28,3 - 1275,6 Бк/кг). Выявлено, что влажность отходов варьировала в интервале 7,3-45,3%, pH–6,81-11,9, электропроводность – 2,89 - 5,75 мСм/см.

2. Токсичность отходов нефтедобывающего комплекса, установленная методами элюатного и контактного биотестирования

Тестированию подвергали 6 отходов (Р1, Р2, Н1, Н2, Н3 и Н4). Четыре отхода было отобрано при очистке нефтепромыслового оборудования. Отход Н4 отбирали в промышленной установке, на которой термическим способом обрабатывали отход Н1. Отход Р1 был получен в лабораторных условиях путём многократного промывания отхода Р2 бензином и четыреххлористым углеродом.

Из отходов были получены водные экстракты и в них определено содержание нефтепродуктов, РЭ и pH (табл. 2). Анализ РЭ показал, что содержание всех изучаемых радионуклидов оказалось ниже уровня обнаружения.

Таблица 2.

Содержание нефтепродуктов и радиоактивных элементов в водном экстракте отходов

Образец	Нефтепродукты, мг/л	^{226}Ra	^{232}Th	^{40}K	pH
Р1	$4,4 \pm 0,9$	<7	<5	<30	7,15
Р2	$35,6 \pm 7,9$	<7	<5	<30	7,24
Н1	$9,0 \pm 2,3$	<7	<5	<30	6,85
Н2	$12,8 \pm 4,2$	<7	<5	<30	6,88
Н3	$11,1 \pm 3,1$	<7	<5	<30	6,84
Н4	$9,1 \pm 2,4$	<7	<5	<30	11,94

Для оценки экологической опасности отходов элюатным методом использовали набор из 7 биотестов. Максимальный уровень токсичности выявлен в тестах с низшими ракообразными *D. magna* (рис. 1).

Исходный водный экстракт всех образцов за исключением образца Н3 вызывал 100% гибель тест-объектов. Для достижения 10% токсичности необходимо было разбавление экстрактов образцов в 20,5-44 раза. Одинаковую чувствительность по отношению к водорастворимым компонентам отходов продемонстрировали инфузории *P. caudatum* и коловратки *B. calyciflorus*. В обоих случаях самым опасным оказался отход Н4 (K_{p10} 16,0 \pm 3,2 и 18,0 \pm 3,6 соответственно). Ни один из исходных экстрактов отходов не вызвал 100% изменения тестовой функции водорослей *S. quadricauda*, пресноводных рачков *T. platyurus* и растений *R. sativus*.

На основании средних значений K_{p10} , рассчитанных для всех отходов использованные тесты могут быть расположены в следующий ряд: тест с *D. magna* (K_{p10} =30.1) > тест с *B. calyciflorus* (K_{p10} =13.0) > тест с *P. caudatum* (K_{p10} =12.3) > тест с *S. quadricauda* (K_{p10} =7.6) \geq тест с *R. sativus* (K_{p10} =7.5) > тест с *T. platyurus* (K_{p10} =6.2) > тест с *B. pumilus* (K_{p10} =4.2) > тест Эколюм (K_{p10} =1.0).

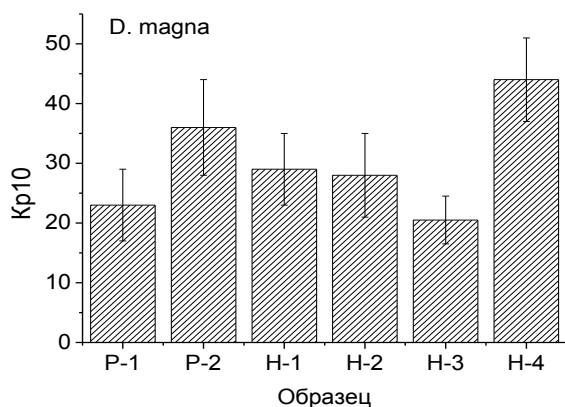


Рисунок 1 Токсичность отходов в элюатном тесте с использованием *D. magna*

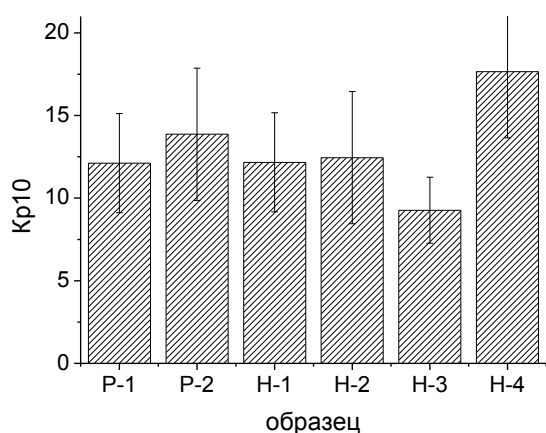


Рисунок 2 Средние значения токсичности отходов, рассчитанные с учетом всех результатов тестирования

такой способ обработки отхода, несмотря на то, что он снижает содержание УВ, приводит к увеличению негативного воздействия отхода на организмы окружающей среды. В целом не обнаружено прямой корреляции между содержанием нефтепродуктов в экстракте отходов и уровнем их токсичности. Скорее всего, это связано с тем, что в водный экстракт могут переходить и метаболиты, образующиеся в процессе хранения отходов, которые также влияют на уровень токсичности. Поскольку в водный экстракт переходит незначительное количество РЭ (ниже предела обнаружения), вероятно, эти элементы не оказывают влияния на уровень токсичности отходов.

Процедура контактного биотестирования позволяет проанализировать исходные образцы без получения водного экстракта. В качестве тест-объектов были использованы бактериальный тест на основе *B. pumilus* и растительный тест на основе *R. sativus* L (рис. 3). В тесте с растениями наивысшую токсичность продемонстрировал образец P1 ($Kp_{10}=36$), а образцы H1, H2 и H3 не оказывали негативного эффекта на растения. В случае бактериального теста максимальная токсичность установлена для образца H4 ($Kp_{10}=21$).

Для каждого отхода были рассчитаны средние значения Kp_{10} по результатам тестирования всеми тестами (рис. 2). Установлено, что токсичность отхода P1 составила 87% от токсичности отхода P2. Эти результаты прогнозируемы, поскольку отход P1 получен путем удаления нефтяного компонента из отхода P2 и в водном экстракте отхода P1 содержание нефтепродуктов ниже. При анализе токсичности отходов H1 и H4 получены обратные результаты: токсичность отхода H4, в котором УВ были удалены термическим методом оказалась в 1,5 раз выше по сравнению с необработанным отходом H1.

Скорее всего такой эффект связан с тем, что при термической обработке существенно изменяется кислотность отхода. Так, pH водного экстракта отхода H4 составляет 11,9, тогда как в случае остальных отходов значения pH варьируются в интервале 6,8-7,2. Таким образом, скорее всего,

При сравнении чувствительности элюатного и контактного биотестирования выявлено,

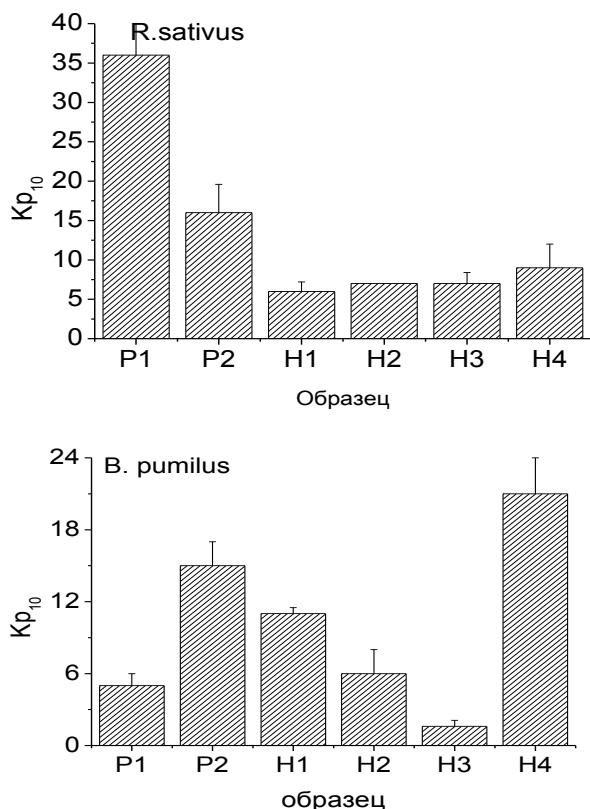


Рисунок 3 Токсичность отходов в контактном тесте с использованием *R. sativus*(А) и *B. pumilus*(Б).

что чувствительность контактного бактериального теста оказалась выше по сравнению с таковой элюатного. Так, для пяти образцов K_{p10} , установленная для контактного теста, была существенно выше. Похожая зависимость выявлена для теста с *R. sativus*L.

В целом, все проанализированные отходы представляют опасность для окружающей среды и на основании их тестирования с *D. magna*, *P. caudatum*и *S. quadricauda* могут быть отнесены к 3 классу опасности.

3. Миграция компонентов отходов по почвенному профилю и их воздействие на качество почвы и состояние почвенного биоценоза

Характеристика почвенных

профилей. В эксперименте использовали отходы P1 и P2. Выявлено, что размещение на поверхности колонок отхода P2 привело к увеличению содержания в почве нефтепродуктов (рис 4а). При этом, в среднем, миграция нефтяных компонентов из отхода P2 в верхний слой почвы составила 4%. В образцах Н(0-20) их содержание оказалось достоверно выше такового содержания в образцах К(0-20) в 3,5 раза. Определение фракционного состава нефтепродуктов верхнего горизонта почвы колонок Н выявило примерно одинаковое соотношение фракций: 33,33% ароматических УВ, по 25% смол и асфальтенов, 16,67% предельных УВ. В колонке P1 не обнаружено увеличение содержания нефтепродуктов. Размещение отхода P1 привело к увеличению в почве РЭ (рис 4б). Содержание ^{226}Ra при внесении отхода P1 в верхнем слое почвы Р(0-20) оказалось выше в 3,5 раза по сравнению с образцами К(0-20). Схожие результаты получены и по ^{232}Th : превышение над контрольным вариантом составило 1,6 раз. Не обнаружено достоверных различий с контролем в содержании ^{226}Ra , ^{232}Th в образцах Р(20-40) и Р(40-60). Ни в одном из слоев не выявлено увеличения содержания ^{40}K . Несмотря на то, что при размещении отходов на почве было уравнено количество РЭ, во всех почвенных образцах, отобранных в колонках Н, не было обнаружено достоверных различий в содержании РЭ с контрольным вариантом. Поскольку РЭ в основном концентрируются в твердой матрице отходов (Gazineuetal., 2005), скорее всего, наличие органического вещества в отходе P2 обуславливает их меньшую миграцию в почву.

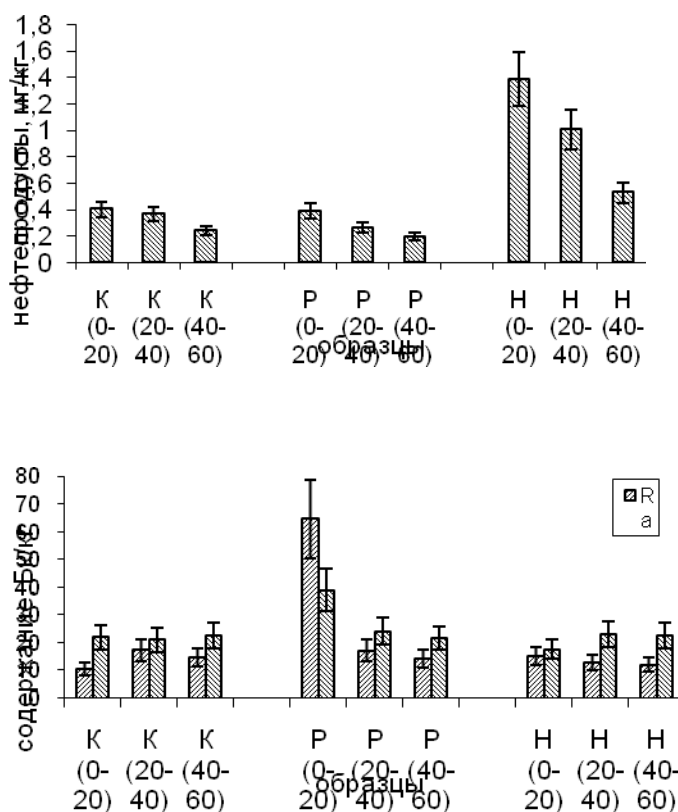


Рисунок 4 Содержание нефтепродуктов (А) и РЭ (Б) в образцах почвенных колонок

Размещение отходов на поверхности почвы не привело к изменению кислотности. Обнаружено увеличение электропроводности верхнем слое почвенных образцов колонок Р и Н, причём наибольшее увеличение (в 3,6 раз) отмечено в образцах Н(0-20). Это косвенно свидетельствует о том, что в верхние слои почвы выщелачиваются хлориды и сульфаты, входящие в состав отходов, что согласуется с данными Marin с соавторами (2005).

Характеристика микробного сообщества образцов почвенных колонок.

Микробная биомасса является параметром, наиболее часто используемым для характеристики сообществ (Leeetal., 2008;Tangetal., 2010, 2012). Уровень микробной биомассы в верхнем горизонте

контрольной колонки составил $27,6 \pm 6$ мгС_{мик}/кг, значение которой снижалось в образцах К(20-40) и К(40-60) в 1,5 и 4,6 раз соответственно (рис.5). Тенденция снижения микробной биомассы в зависимости от глубины отбора проб обнаружена и в колонках Н и Р. Абсолютные значения микробной биомассы в образцах Н(0-20) оказались достоверно ниже таковых колонок К. В образцах, отобранных на нижних горизонтах этих колонок, достоверных различий в значениях микробной биомассы с контрольными колонками не обнаружено. Наши данные не согласуются с ранее полученными данными, согласно которым, снижение уровня микробной биомассы в почве наблюдается при содержании нефтяных компонентов более 5-10% (Francoetal., 2004; Labudetal., 2007; Lietal., 2007), а при более низких концентрациях нефть может оказывать стимулирующий эффект (Joergensenetal., 1995; Margesinetal., 2000; Caravacaetal., 2003). Возможно, негативный эффект на микробную биомассу связан с присутствием в отходах большого количества ароматических углеводов, известных своей высокой токсичностью (Labudetal., 2007, Serranoetal., 2009), либо с образованием в процессе трансформации нефтяных компонентов метаболитов неизвестной токсичности и резистентности (Morelli et al., 2005). В образцах, отобранных на разных горизонтах колонок Р, не установлено достоверных различий в уровне биомассы при сравнении с контрольным вариантом. Это позволяет предположить, что радиоактивные

элементы, несмотря на их более высокое содержание по сравнению с контрольным вариантом, не оказывают негативного влияния на микробную биомассу.

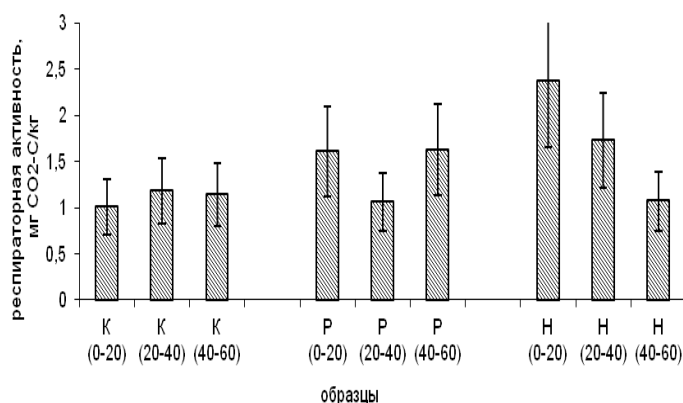


Рисунок 5 Респираторная активность в образцах почвенных колонок

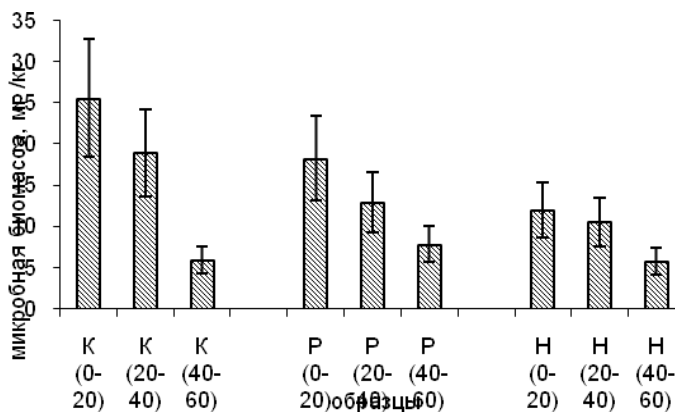


Рисунок 6 Микробная биомасса в образцах почвенных колонок

Это подтверждается тем, что рассчитанная на основании TerrestrialmodelR&D128 (Coppelstoneetal., 2001, Jonesetal. 2003) доза для доминирующего элемента ^{226}Ra составила 0,7 Гр, тогда как согласно данным литературы, эффект на микроорганизмы обнаруживается при дозе 40-50 Гр (Yardinetal. 2000; Jonesetal. 2004; Buchanetal., 2012).

Уровень респираторной активности в колонках К не зависел от глубины отбора проб и варьировал в интервале 1-1,2 мгСО₂-С/кг час (рис.6). Обнаружено увеличение респираторной активности в образце Н (0-20) по сравнению с респираторной активностью образцов К(0-20) в 2,4 раза. В случае остальных проб достоверных различий не установлено. Уровень респирации в образцах колонок Р достоверно не отличался от образцов

колонок К и не зависел от глубины отбора. Увеличение респираторной активности микробного сообщества почвы, загрязнённой нефтью связывают с использованием микроорганизмами углеводов в качестве источника углеродного питания (Marinetal., 2005, Labudetal., 2007, Leeetal., 2008). Однако, более вероятным является предположение о преодолении стресса микробным сообществом, что приводит к увеличению метаболической активности микроорганизмов (Chanderetal., 1991; Francoetal., 2004).

Результат анализа целлюлазной активности во всех образцах, отобранных по почвенному профилю, показал, что её уровень был максимальным в верхнем слое (0-20см) и достоверно снижался по почвенному профилю. Не выявлено каких-либо закономерностей при анализе дегидрогеназной активности почв: абсолютные значения активности достоверно не различались как в разных колонках, так и в образцах, отобранных в разных почвенных профилях. Миграция компонентов отходов в почву в основном не оказала достоверного влияния на общую численность бактерий.

Исключение составили образцы Н(0-20) и Н(20-40), в которых обнаружено увеличение их численности по сравнению с таковой в контрольных образцах.

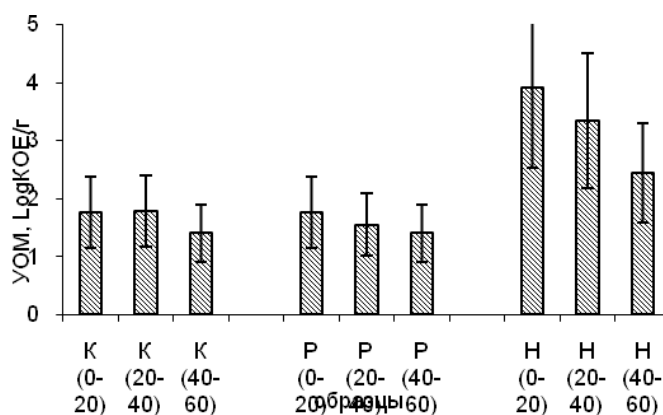


Рисунок 7 Численность УОМ в образцах почвенных колонок

При анализе численности УОМ выявлено их достоверное увеличение по сравнению с контролем во всех почвенных образцах колонки Н (рис. 7). Максимальное увеличение численности УОМ выявлено в верхнем слое; их количество составило 20% от общей численности выселенных на среде МПА бактерий, увеличение численности УОМ, как ответная реакция на внесение УВ, связано с присутствием в почве нефтяных компонентов, которые служат

источником питательных элементов для указанной группы микроорганизмов (Киреева с соавт., 2001; Новоселова, 2004; Tahhanetal., 2009). Анализ образцов, отобранных по профилю колонок Н, показал снижение их численности. Со снижением численности УОМ коррелирует снижение содержания нефтяных компонентов ($R=0,92$).

Дисперсионный и кластерный анализ. Миграция компонентов отходов повлияла на биологические характеристики почвы, однако, различия в биологических показателях обнаружены и при анализе почвенных образцов, отобранных на разных горизонтах. Это свидетельствует о том, что почвенные характеристики зависят как минимум от двух факторов: первый - наличие и тип отхода и второй - глубина отбора проб. Для того, чтобы оценить статистическую значимость каждого из факторов был проведён дисперсионный анализ. При анализе исходили из того, что оба фактора действуют независимо. Предполагали, что факторами, определяющими размах колебания (дисперсию) значений конкретного показателя являются фактор «наличие и тип отхода» (fMatter), фактор «глубина отбора» (fLayer), фактор «колонка» (fSite). Очевидно, что в дисперсию значения показателя могут вносить вклад и другие факторы, не учтённые нами. Их вклад является остаточной дисперсией модели (Residual). Наблюдаемый эффект может быть представлен как: $Y_{ijk} = \alpha_0 + \beta_i + \gamma_j + \varepsilon_{ijk}$, где Y_{ijk} - наблюдаемая картина для i-го показателя в j-м слое, наблюдаемая в k-й колонке; α_0 - значение при размещении первого образца отхода в верхнем слое в первой колонке (база сравнения – константа, изменчивости нет); β_i - изменение при внесении i-го отхода вместо первого; γ_j - изменение для j-го слоя вместо верхнего; ε_{ijk} - случайная ошибка. Если считать влияние отхода и слоя независимыми (ошибка всегда считается независимой), то дисперсия (изменчивость) наблюдаемой величины $Var(Y) = Var(\beta) + Var(\gamma) + Var(\varepsilon)$ раскладывается на составные части, которые можно выразить в процентах, взяв всю изменчивость $Var(Y)$ за 100%.

В результате дисперсионного анализа с учётом вышеуказанных посылок установлено, что основной вклад (70%) в дисперсию показателя нефтепродуктов вносит фактор «наличие и тип отхода». Доминирование этого фактора (80%) выявлено также при анализе дисперсии такого показателя как численность УОМ. Фактор «глубина отбора» вносит наиболее существенный вклад в дисперсию таких показателей как электропроводность (45,6%), содержание ^{40}K (53,65%) и микробная биомасса (54,6%). В случае ряда показателей установлено, что ни тот ни другой фактор не оказывали существенного вклада в дисперсию их значений. Об этом свидетельствует тот факт, что максимальное значение доли дисперсии получено для остаточной дисперсии. К числу таких показателей относятся содержание ^{226}Ra (59,3%), содержание ^{232}Th (73,95%), pH (62,4%), респираторная активность (84,5%).

Рассмотрение биологических параметров по отдельности не может дать ответ на вопрос, влияет ли размещение отходов на биологические параметры почв и, в случае положительного ответа, на какую глубину распространяется этот эффект. Для того, чтобы решить эту задачу, нами был применён кластерный анализ. Для этого каждая почвенная проба, отобранная в колонках на разных глубинах, была представлена нормализованными значениями показателей, определяемых в эксперименте. Каждая

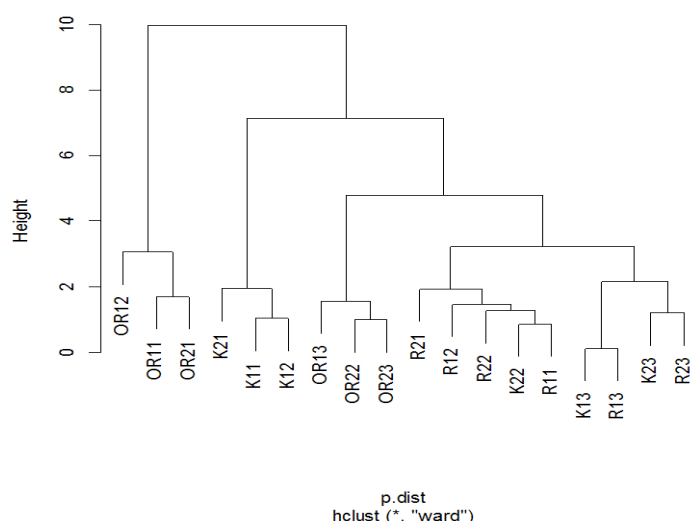


Рисунок 8. Дерево иерархической кластеризации

почвенная проба считалась отдельным объектом, который использовали для кластерного анализа.

Дерево иерархической кластеризации представлено на рис. 8. На дереве отчетливо видно три основных кластера. В первый кластер объединены три образца, два из которых отобраны в верхнем слое (0-20 см) колонок Н (OR₁₁ и OR₁₂), а также один образец слоя 20-40 см (OR₂₁).

Первая цифра индекса обозначает номер колонки, вторая - горизонт отбора. В состав второго кластера входят также три образца, два - отобранные в контрольных колонках (K) в верхнем почвенном горизонте и один в слое 20-40 см. Все остальные образцы были объединены в третий кластер. Более подробное рассмотрение объединения почвенных образцов в третьем кластере позволяет выделить группу, включающую образцы, отобранные с нижних слоёв колонок Н. Необходимо отметить, что все образцы колонок Р были объединены в группу вместе с контрольными образцами, отобранными в нижних слоях. Это свидетельствует о том, что достоверный эффект на биологические показатели почв оказывает размещение необработанного отхода (Р2), причём этот эффект наиболее выражен в верхнем слое почвы. Начиная с глубины 20 см, влияние этого отхода снижается и становится недостоверным. Отход, из которого

удалён нефтяной компонент (P1), практически не оказывает влияния на биологическую активность почв.

4. Биоремедиация нефтесодержащих отходов

Для биоремедиации отходов использовано 2 ранее выделенных штамма деструкторов нефти – RG1 и RG2. Определена видовая принадлежность выделенных штаммов. Идентификацию проводили на основе анализа нуклеотидной последовательности 16S рНК. Результаты сравнения установленной нуклеотидной последовательности 16S рНК изучаемых штаммов с таковыми последовательностями, содержащимися в базе данных www.ncbi.nlm.nih.gov, позволяют идентифицировать изучаемый штамм RG1 с 96% вероятностью как *Bacillusthuringiensis*, штамм RG2 с 93% вероятностью как *Bacilluspumilus*.

Изменение содержания нефти, фракционного состава и РЭ процессе биоремедиации. Для анализа биodeградации углеводов отхода были смоделированы условия ландфарминга (вариант ОП), биостимуляции (вариант ОК), и сочетания этих приемов с биоаугментацией (варианты ОПК, ОПКМ и ОКМ). К 123 суткам культивирования выявлено снижение содержания нефтепродуктов на 79, 79 и 72% соответственно в вариантах ОПК, ОПКМ и ОП (рис. 9). Меньшее снижение нефтепродуктов наблюдается в вариантах ОК и ОКМ, составившее 53 и 65% соответственно.

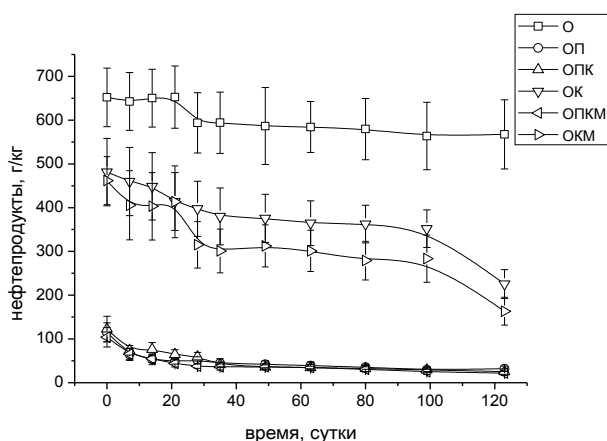


Рисунок 9. Изменение содержания

нефтепродуктов при ремедиации отхода НТ1

составляет 12%.

Внесение микроорганизмов оказывает стимулирующее действие при ремедиации образцов с начальным содержанием нефтепродуктов 461-481 г/кг (варианты ОК и ОКМ), тогда как при более низком содержании нефтепродуктов (103-121 мг/кг) такой эффект не был обнаружен. Возможно, это связано с тем, что разбавление

почвой отхода приводит к активизации аборигенной микрофлоры, на фоне которой активность интродуцированных микроорганизмов не вносит существенно вклада в деградацию углеводов. В литературе представлены данные как об увеличении эффективности биodeградации углеводов, содержащихся в нефтяных отходах, интродуцированными микроорганизмами, так и об отсутствии эффекта (Liu et al., 2009; Kauppi et al., 2011; Tahhan et al., 2011). Для всех вариантов смесей с отходом НТ1 был определён фракционный состав в начале и конце инкубирования. Как видно из данных рис. 10, тенденция изменения компонентов отдельных фракций была аналогична для вариантов ОП, ОПК и ОПКМ. Наиболее быстро деструкции подвергаются предельные и ароматические углеводороды, что согласуется с данными литературы (Atlas, 1981, Tahhan et al., 2011). За 123 суток инкубирования происходит снижение ароматических

углеводородов на 90-92%, предельных – на 80-89%. В меньшей степени происходит снижение компонентов фракций смол и асфальтенов. В случае группы образцов ОК и ОКМ обнаружено максимальное снижение компонентов фракции насыщенных углеводородов (86-88%), второй по скорости снижения оказалась фракция смол (64-73%) (рис 11). Незначительно от скорости последней отличалось снижение ароматических углеводородов, которое составило 47-53%. Как и в предыдущей группе наименее активное снижение продемонстрировали компоненты фракции асфальтенов. Скорее всего, это связано с тем, что к моменту финального отбора проб в образцах этой группы остаточное содержание нефтепродуктов оказалось существенно выше по сравнению с образцами первой группы.

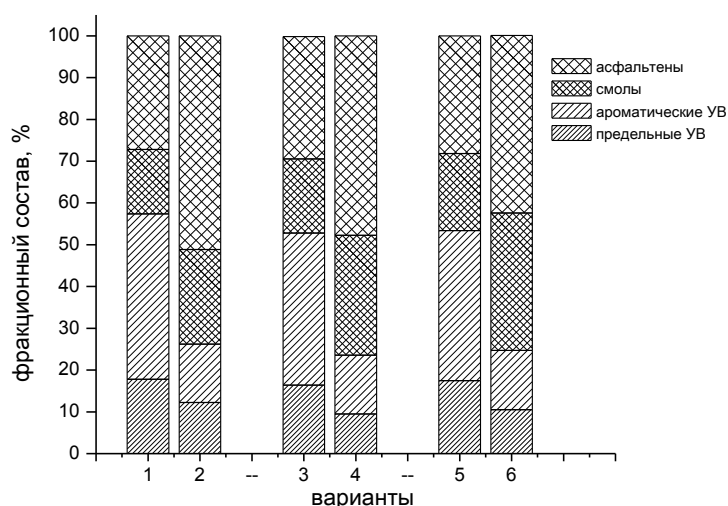


Рисунок 10. Фракционный состав смесей на 1 и 120 сутки опыта: 1,3,5-ОП, ОПК, ОПКМ на сутки, 2,4,6 – ОП, ОПК, ОПКМ на 120 суток.

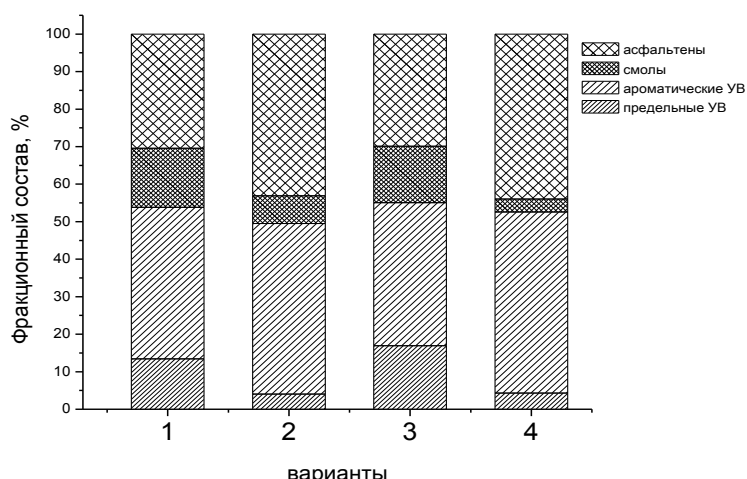


Рисунок 11. Фракционный состав смесей на 1 и 120 сутки опыта: 1,3 – ОК, ОКМ на 1 сутки, 2,4 – ОК, ОКМ на 120 суток. Цифры на рисунке – содержание фракции в г/кг смеси.

Это свидетельствует о том, что процесс ремедиации в этих вариантах не завершён. Вероятно, при продлении срока ремедиации содержание ароматических углеводородов также снизится. Различная скорость деградации компонентов нефтяных фракций приводит к изменению фракционного состава в сторону увеличения содержания фракций асфальтенов и смол в случае эффективной ремедиации и в сторону асфальтенов и ароматических углеводородов при незавершённой ремедиации.

Установлено незначительное увеличение содержания РЭ в процессе ремедиации в среднем в 1,1 раза по сравнению с исходным содержанием, что связано с их концентрированием за счёт минерализации органического вещества. Аналогичное явление установлено для металлов, концентрация которых увеличивается в компостных кучах при минерализации

органического вещества (Pareetal., 1999). В литературе представлены данные о том, что

негативный эффект на микроорганизмы оказывает доза от 40 Гр (Jonesetal. 2004) до 50 кГр (Yardinetal. 2000; Buchanetal. 2012), рассчитанная на основании концентрации ^{226}Ra . В нашем исследовании полученная почвенными микроорганизмами доза, определённая с использованием модели R&D128 (Terrestrialmodel) (Coppelstoneetal. 2001; Jonesetal. 2003) составляет 0,5 Гр, что существенно ниже значения, вызывающего негативный эффект. Это позволяет считать, что основным фактором, определяющим эффекты отхода на микробные сообщества, является содержание нефтепродуктов.

Изменение биологической активности в процессе биоремедиации. В процессе инкубирования смесей с отходом НТ1 были определены изменения уровня $S_{\text{мик}}$, респираторной и уреазной активности, численности гетеротрофов и УОМ. Как видно из данных, представленных на рис. 12, в варианте ОП уровень $S_{\text{мик}}$ существенно не отличался от такового в варианте П. В то же время внесение в смесь компоста и инокуляция смеси микроорганизмами (варианты ОПК и ОПКМ) привело к увеличению $S_{\text{мик}}$ в 1,3 -2 раза соответственно по сравнению с почвой. В процессе ремедиации, как в почве, так и в смесях с отходом отмечены флуктуирующие изменения $S_{\text{мик}}$, причем к концу эксперимента различия между ними становятся менее существенными.

Увеличение $S_{\text{мик}}$ при рекультивации почвы, загрязнённой нефтью в дозах 5-10% было

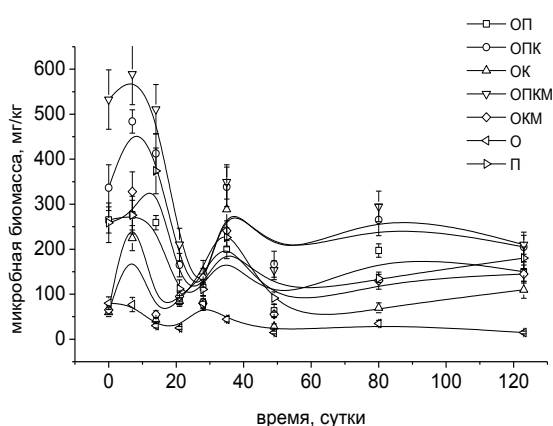


Рисунок 12. Изменение микробной биомассы при ремедиации отхода НТ1

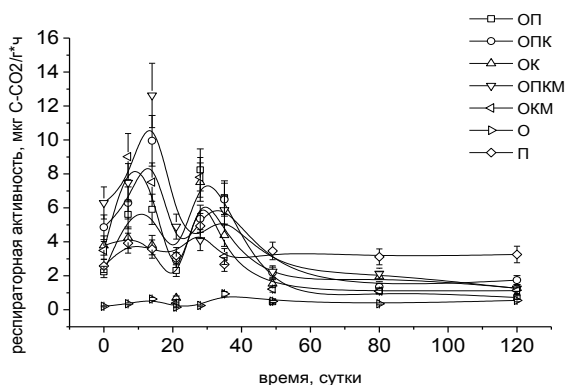


Рисунок 13. Изменение респираторной активности при ремедиации отхода НТ1

отмечено и другими авторами (Joergensenetal., 1995; Marinetal., 2005). Обработка отхода компостом и микроорганизмами (варианты ОК и ОКМ) приводит к увеличению $S_{\text{мик}}$. Скорее всего, это связано с тем, что компост оказывал структурирующее воздействие, обеспечивая благоприятные условия для развития аэробных микроорганизмов. В то же время, высокое начальное содержание нефтепродуктов в этих вариантах обусловило более низкий уровень $S_{\text{мик}}$ по сравнению с остальными вариантами.

При анализе респираторной активности выявлено, что на 14 сутки инкубирования наблюдается увеличение респираторной активности в образцах ОП, ОПК, ОПКМ в 1,7, 2,8 и 3,5 раза соответственно по сравнению с образцом П (рис.13). В дальнейшем происходит снижение активности с повторным ее повышением на 35 сутки. Далее уровень респирации стабилизируется. Сравнение

уровня респираторной активности в вариантах ОК, ОКМ показывает, что внесение в

отход НТ1 компоста и микроорганизмов приводит к увеличению респираторной активности в 2-30 раз по сравнению с вариантом О в течение всего эксперимента. Следует отметить, что в вариантах смесей с добавлением микроорганизмов (ОПКМ, ОКМ) респираторная активность выше по сравнению с вариантами без внесения бактерий (ОПК, ОК).

Численность микроорганизмов является индикатором их жизнеспособности и отражает биodeградационный потенциал загрязнённой системы (Mishra et al., 2001, Roldan-Carrillo et al., 2011). Поскольку основную роль в биodeградации нефти играют УОМ, в процессе биоремедиации была определена их численность, а также численность гетеротрофных микроорганизмов.

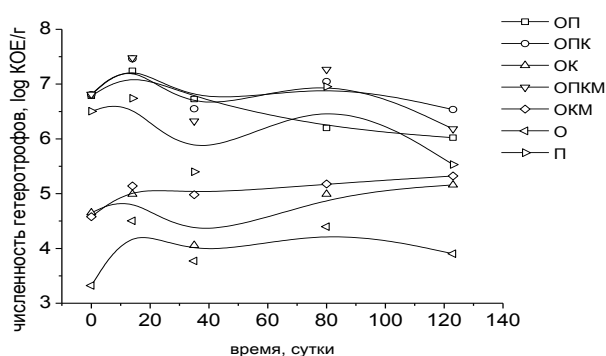


Рисунок 14. Изменение численности гетеротрофных организмов при ремедиации отхода НТ1

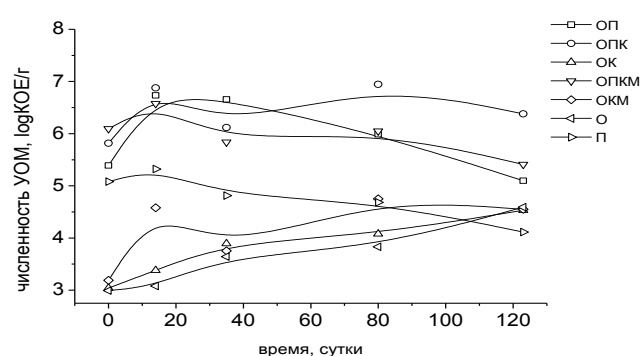


Рисунок 15. Изменение численности углеводородокисляющих микроорганизмов при ремедиации отхода НТ1

Как видно из результатов, представленных на рис. 14 и 15 численность гетеротрофных микроорганизмов увеличивается при смешивании почвы с отходом и в среднем выше на протяжении эксперимента

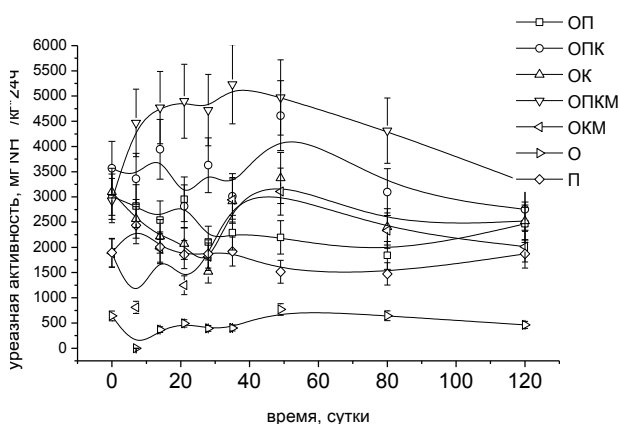


Рисунок 16. Изменение уреазной активности при ремедиации отхода НТ1.

деструкторами приводит к увеличению численности гетеротрофов в среднем за эксперимент в 1,8 и 2,8 раза. Увеличение численности УОМ составляет 1,1 и 2,6 раз. Установленное явление вполне закономерно: во-первых, смешивание отхода с почвой или компостом приводит к увеличению пористости отхода и, как следствие, к лучшей аэрации, во-вторых, углеводороды нефти являются субстратом для бактерий этой

в среднем выше на протяжении эксперимента в 1,7, 3,2 и 3,2 раза для вариантов ОП, ОПК и ОПКМ соответственно. Более существенные различия выявлены при сравнении численности УОМ. Так, их численность в смесях, подвергаемых ремедиации, оказывается в среднем в 24, 45 и 15 раз выше для вариантов ОП, ОПК и ОПКМ соответственно по сравнению с их численностью в почве. Ремедиация отхода путем смешивания с компостом, а также обработка смеси микроорганизмами-

группы, и увеличение их численности отражает превращение углерода в новую клеточную массу.

Активность ферментов азотного обмена является важным диагностическим показателем интенсивности процессов мобилизации почвенного азота. В связи с этим были определены изменения в процессе ремедиации отхода уреазной активности. Согласно полученным данным (рис. 16) уровень уреазной активности образцов ОК и ОКМ увеличивается в 2,5-7,3 раза по сравнению с отходом. Следует отметить, что образцы с внесением микроорганизмов (ОПКМ и ОКМ) демонстрируют наибольшую уреазную активность по сравнению с аналогичными образцами без внесения бактерий (образцы ОПК и ОК). Полученные данные согласуются с данными литературы. Известно, что уреазная активность в загрязнённых нефтью почвах со временем возрастает (Caravacaetal., 2003; Tejadaetal., 2007; Новосёлова, 2008).

Изменение фитотоксичности в процессе биоремедиации. Как видно из представленных данных (рис 17), на протяжении всего периода исследования почва

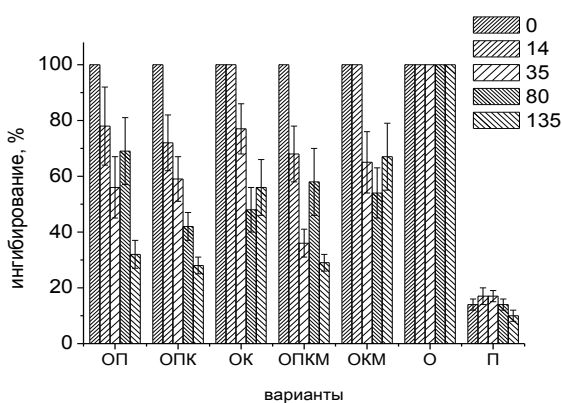


Рисунок 17. Изменение фитотоксичности в процессе ремедиации отхода НТ1

(вариант П) не оказывает негативного влияния на всхожесть семян подсолнечника *Н. annuus*: ингибирование всхожести семян варьирует от 10 до 17%. В то же время при тестировании отхода, который подвергается только перемешиванию (вариант О) обнаружен 100%-ный ингибирующий эффект. При

ремедиации отхода происходит снижение уровня фитотоксичности.

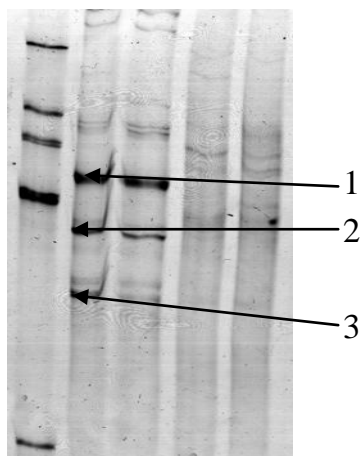
Так, в вариантах ОП, ОПК и ОПКМ

фитотоксичность снижалась со 100% в начале эксперимента до 32, 28 и 29% соответственно к 135 суткам эксперимента. В вариантах ОК и ОКМ, которые характеризовались более высоким начальным содержанием нефтепродуктов (459 и 405 г/кг) выявлено существенно меньшее снижение фитотоксичности. Во-первых, в течение первого месяца отсутствует всхожесть семян, во-вторых, к концу эксперимента фитотоксичность составляет 67 и 54%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что за четыре месяца в вариантах ОК и ОКМ ремедиация не завершилась. По уровню фитотоксичности, установленной к концу эксперимента смеси могут быть расположены в следующий ряд О>ОК>ОКМ>ОП>ОПК=ОПКМ. Во всех вариантах опыта обнаружено немонокотное снижение уровня фитотоксичности.

Изменение структуры микробного сообщества в процессе биоремедиации.

Поскольку одним из наиболее успешных способов ремедиации отходов явилась обработка отхода почвой (вариант ОП), на следующем этапе было изучено микробное сообщество в конце эксперимента методами молекулярной биологии. Для сравнения использовали чистую почву (вариант П). Использовали метод анализа

конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (Single-strand conformation polymorphism, SSCP). Для этого, на первом этапе была получена и очищена тотальная ДНК. На следующем этапе была проведена амплификация выделенных фрагментов с праймерами Com1/Com2 и осуществлено разделение ампликонов 16S рРНК бактерий с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 18).



КОП ОПП П

Рисунок 18. Разделение амплифицированных фрагментов 16S рРНК бактерий в образцах П и ОП при электрофорезе

При анализе результатов разделения ампликонов выявлено, что образец П характеризуется большим количеством полос одинаковой интенсивности, что свидетельствует о том, что в почве содержится большее количество видов бактерий. Кроме этого установлено, что количество полос в образце П значительно больше по сравнению с образцом ОП. Особо необходимо отметить, что в образце ОП обнаружено несколько доминирующих полос, которые не выявлены в образце чистой почвы. Это позволяет предположить, что в сообществе под воздействием компонентов отхода произошла селекция штаммов,

устойчивых к данному виду воздействия. Действительно, по мнению ряда авторов, длительное внесение нефти приводит к резкому изменению структуры сообщества: оно благоприятствует относительному развитию одних и уменьшению других видов, приводит к появлению новых видов в спектре бактериального сообщества (Tangetal., 2010; Reddyetal., 2011; Lladoetal., 2012; Morietal., 2013).

На следующем этапе из геля были вырезаны фрагменты (участки доминирующих полос), содержащие ДНК, клонированы с помощью бактерий *E. coli*, а затем клоны идентифицированы. Для каждого вырезанного фрагмента анализировали по 3-4 клон.

Все клоны полосы 1 (a, f, j, k) продемонстрировали высокую схожесть (98,8 - 99%) с родом *Dyella*. Необходимо отметить, что штамм *Dyellasp.* 528F-2 (EU872214) ранее был обнаружен в почвах, загрязнённых нефтью, а штамм *Dyellaginsengisolistrain*LA-4(EF191354) был изолирован как деструктор бифенила (Lietal., 2009). Бифенил является одним из компонентов сырой нефти.

Три клоны полосы 2 (с, f, и j) были близко схожи со *Sinobacterflavus* (EF154515) (99,3 -100%) и один клон с *Pseudoxanthomonasspadix* (AM418384) (99,5%). *Pseudoxanthomonasspadix*(Youngetal., 2007). Среди бактерий, относящихся к роду *Pseudoxanthomonas*, обнаружено несколько деструкторов нефти (Kumarietal., 2011; Pateletal., 2012). Секвенция нашего клона, отнесенного к *Sinobacterflavus*, показала высокое сходство с секвенцией некультивируемой бактерии *Proteobacteria*МК11 (EF173315), которая была выявлена в почве, загрязнённой углеводородами (Lowetal., 2007).

Parvibaculum lavamentivorans (AY387398), секвенция которой совпадала на 95,6-95,8% с секвенциями двух клонов полосы 3 (g, j), способна к омега-оксигенированию коммерческого сурфактанта линейного алкилбензенсульфоната (Schelehecketal., 2007). Более близкородственная секвенция (99,5 – 99,8%) относилась к секвенции бактерии донных отложений 22-39 (EU167984), которая была изолирована как деструктор полициклических ароматических углеводородов из отложений реки Элизабет (Hilyardetal., 2008).

Таким образом нами установлено, что при обработке почвы отходом происходит изменение структуры сообщества в сторону доминирования устойчивых к воздействию нефтяных компонентов видов микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что содержание нефтяных компонентов в отходах нефтедобывающего комплекса варьирует в широких пределах от 30,5 до 880 г/кг. Установлено, что доминирующим элементом в отходах является ^{226}Ra , активная концентрация которого составляет 34-11930 Бк/кг. В меньших количествах присутствуют ^{232}Th (20,2 - 9399,0 Бк/кг) и ^{40}K (28,3-2277,9 Бк/кг). Обнаружено, что фракционный состав отходов отличается для отходов с высоким и низким содержанием углеводов.

2. При анализе токсичности водных экстрактов отходов с использованием тестов на основе бактерий *Bacillus pumilus*, коммерческого теста «Эколюм», инфузорий *Paramecium caudatum*, водорослей *Scenedesmus quadricauda*, низших ракообразных *Daphnia magna*, пресноводных рачков *Thamnocephalus platyurus*, коловраток *Brachionus calyciflorus*, высших растений *Raphanus sativus* L. обнаружено отсутствие прямой корреляции между содержанием нефтепродуктов и уровнем их токсичности, что может быть связано как с различиями во фракционном составе отходов, так и с наличием токсичных метаболитов. Выявлено, что отход, подвергнутый термической обработке, более токсичен по сравнению с исходным. Показано, что все проанализированные отходы представляют опасность для окружающей среды и на основании их тестирования с *D. magna*, *P. caudatum* и *S. quadricauda* могут быть отнесены к 3 классу опасности.

3. Показано, что размещение на поверхности почвенных колонок отходов с высоким содержанием нефтепродуктов приводит к миграции по почвенному профилю нефтяных компонентов в количестве 4%, и не сопровождается миграцией радиоактивных элементов, что возможно связано с их связыванием органической матрицей отходов. При размещении отхода с низким содержанием нефтепродуктов содержание ^{226}Ra и ^{232}Th в верхнем слое почвы оказывается выше в 3,5 и 1,6 раза по сравнению с необработанной почвой соответственно. При анализе состояния микробного сообщества почв колонок было установлено, что миграция углеводов приводит к снижению уровня микробной биомассы, увеличению респираторной активности почв, увеличению содержания гетеротрофных микроорганизмов и УОМ, наиболее

выраженным в почве верхнего горизонта (0-20см). Не выявлено достоверных различий в состоянии микробного сообщества в присутствии радиоактивных элементов, поступивших в почву из отхода.

4. С применением дисперсионного анализа результатов анализа микробных сообществ почвенных колонок выявлено, что основной вклад (80%) в дисперсию показателя численность углеводородоокисляющих бактерий вносит фактор «наличие и тип отхода». Фактор «глубина отбора» вносит наиболее существенный вклад в дисперсию показателей микробная биомасса (54,6%) и целлюлазная активность. Ни тот ни другой фактор не вносили существенного вклада в дисперсию значений респираторной и дегидрогеназной активностей. Проведённый кластерный анализ результатов показал, что достоверный эффект на биологические показатели почв оказывает размещение отхода с высоким содержанием нефтяного компонента, причём этот эффект наиболее выражен в слое почвы 0-20 см.

5. Установлено, что способы биоремедиации ландфарминг и биостимуляция обеспечивают снижение нефтепродуктов и фитотоксичности отхода. Инокуляция смесей выделенными микроорганизмами-деструкторами нефти (*B. thuringiensis* и *B. pumilus*) эффективна при высоком содержании нефтепродуктов (461, 481 г/кг) и не оказывает влияния при их начальном содержании 120 г/кг. Различная скорость биodeградации предельных, ароматических углеводородов, асфальтенов и смол приводит к изменению фракционного состава отхода к концу процесса ремедиации в сторону увеличения содержания двух последних фракций.

6. Выявлено, что в процессе биоремедиации отхода методом ландфарминга происходит изменение структуры сообщества исходной почвы: уменьшается разнообразие видов, появляются доминирующие виды, идентифицированные как *Dyellasp.*, *Sinobacterflavus* и *Parvibaculum lavamentivorans*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка ВАК

1. **Гумерова Р.Х.** Изменение фитотоксичности отхода нефтедобывающего комплекса, содержащего радиоактивные элементы, при их ремедиации / **Р.Х. Гумерова**, С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. - 2011.- №3.-С.127-136.
2. Селивановская С.Ю. Влияние радиоактивных отходов нефтедобывающего комплекса на микробное сообщество серой лесной почвы / С.Ю. Селивановская, **Р.Х. Гумерова**, О.Р. Бадрутдинов, П.Ю. Галицкая // Вестник РУДН. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. - 2011.- №4.- С.85-97
3. **Гумерова Р.Х.** Моделирование ремедиации отходов нефтедобывающего комплекса, содержащего радиоактивные элементы, методом ландфарминга / **Р.Х. Гумерова**, А.З. Низамутдинова, С.Ю. Селивановская // Вестник Уральской медицинской академической науки- 2011.-№4/1 (38). – С.169-170.

4. Селивановская С.Ю. Экологическая токсичность отходов нефтедобывающего комплекса / Селивановская С.Ю., **Гумерова Р.Х.**, Степанова Н.Ю., Галицкая П.Ю. //Токсикологический вестник.-2012.-№6.-С.76-81.
Статьи в других журналах, научных сборниках, тезисы докладов на конференциях
5. **Гумерова Р.Х.** Опасно ли размещение на почве отходов нефтедобывающего производств / **Р.Х. Гумерова** // Материалы итоговой научно-образовательной конференции студентов Казанского Государственного университета. - Казань, 2008
6. **Гумерова Р.Х.** Влияние отходов нефтедобывающего производства на микробные сообщества и фитотоксичность почв / **Р.Х. Гумерова** // I городская студенческая конференция «Междисциплинарные исследования в области естественных наук», Казань, 2008
7. **Гумерова Р.Х.** Изменение функционирования микробных сообществ и фитотоксичности при размещении на почве отходов нефтедобывающего производства. / **Р.Х. Гумерова** // Материалы 13 Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий», Новосибирск, 2008.
8. **Гумерова Р.Х.** Влияние отходов, содержащих нефть и радионуклиды, на биологическую активность черноземной почвы / **Р.Х. Гумерова** // Сборник научных трудов II Международной научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники-2010». - Уфа: Нефтегазовое дело, 2010. – С. 223-224.
9. **Гумерова Р.Х.** Метод обезвреживания радиоактивных отходов нефтедобывающего комплекса / **Р.Х. Гумерова**, С.Ю. Селивановская // Материалы II Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Прогрессивные технологии и перспективы развития». – Тамбов: Изд-во ООО «ТР-принт», 2010. – С.91-92.
10. **Гумерова Р.Х.** Оценка влияния радиоактивных отходов нефтедобычи на микроорганизмы и растения. / **Р.Х. Гумерова** // Сборник трудов Всероссийской научной конференции с элементами научной школы для молодежи «Экологические проблемы нефтедобычи». - Уфа: Нефтегазовое дело, 2010. – С. 400- 402.
11. Selivanovskaya S.Yu. Microbial activity of grey forest soil contaminated by oily waste /S.Yu. Selivanovskaya, P.Yu. Galitskaya, **R.H. Gumerova**, B.U. Shafigullin // Proceedings of the International Symposium "Euro-ECO - Hanover 2011": Environmental, Engineering - Economic and Legal Aspects for Sustainable Living, Hannover (Germany), 2011. - P. 100-101.
12. **Гумерова Р.Х.** Способы ремедиации радиоактивных отходов нефтедобывающего комплекса / **Гумерова Р.Х.**, Селивановская С.Ю., Галицкая П.Ю., Низамутдинова А.З. // Материалы II Международной научно-практической конференции "Современные проблемы безопасности жизнедеятельности: теория

и практика. Часть II. - Казань: ГУ "Научный центр безопасности жизнедеятельности детей", 2012. - С.111-115.

13. **Selivanovskaya S.** Effects of leakage of compounds from radioactive oily waste on soil microbial community. / S. Selivanovskaya, **R. Gumerova**, P. Galitskaya // Book of abstracts of the 4th International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics (CEMERE) and SECOTOX Conference. - Mykonos island, Greece: Grafima publications, 2013- P.160-161.